

?ss pn =jp 6294796
S2 1 PN=JP 6294796
?t s2/7/all

2/7/1
DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010108710 **Image available**

WPI Acc No: 95-009963/199502

Analysing nucleic acids in sample - by adding DNA probes to sample,
hybridising and sepg. probes

Patent Assignee: HITACHI LTD (HITA)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 6294796	A	19941021	JP 9384433	A	19930412	G01N-033/50	199502

B

Priority Applications (No Type Date): JP 9384433 A 19930412

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
JP 6294796	A		8			

Abstract (Basic): JP 6294796 A

Analysis of nucleic acids in a sample comprises adding a reagent
contg. DNA probes to the sample, thereby hybridising the DNA probes
which are then sepd. from the nucleic acids.

USE - For analysing RNAs.

Dwg.0/3

Derwent Class: B04; D16; J04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/50

International Patent Class (Additional): C12Q-001/68; G01N-027/447;
G01N-033/58

Reference No. 24736-2002EP
Job No. 1932

19. Japan Patent Office (JP) 11. Patent Application Laid-open No.

12. Japan Laid-open Patent Gazette (A) Heisei 6-294796 (1994)

43. Patent Laid-open Date: September 26, 1989 (Heisei 1)

51. Int. Cl.⁵ ID Code
G 01 N 35/50 P
27/447 A
33/58 A

Internal Reference No.
7055-2J
7055-2J
7823-4B
7363-2J

F1

#C12Q 1/68

G01N 27/26 315 2

Examination: Not Requested No. of Claims: 30 (Total 8 pages)

54. Title of Invention	Nucleic Acid Analysis Method
21. Application No.	Heisei 3-106530
22. Date of Filing	April 12, 1991 (Heisei 3)
71. Applicant	000005108 Hitachi, Ltd. 4-chome 6 Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo
72. Inventor	Hideki Kamihara Hitachi, Ltd. Central Research Institute 1-chome 280 Higashi Koigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo
72. Inventor	Kazuhiro ¹ Okano Same address as first inventor
72. Inventor	Kazuko Kawamoto Same address as first inventor
72. Inventor	Hiroko Furuyama Same address as first inventor
74. Agent	Yusuke Hiraki, Patent Attorney

(54) Title of the Invention
Nucleic Acid Analysis Method

(57) Abstract

Objective:

To simultaneously analyze the types and amounts of multiple mRNAs.

Constitution:

The lengths of DNA probes 101, 102 and 103, each to hybridize to multiple target mRNAs, are varied in order to alter the mobilities of the DNA probes so as to allow for identification by

¹ ILS Note - Alternative ways of reading this name are "Kazuaki" and "Kazunobu."



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

electrophoresis, and the multiple mRNAs are then identified and simultaneously analyzed. Only those DNA probes that have hybridized to the mRNAs are collected, whereupon these DNA probes that have hybridized respectively to the multiple mRNAs are released by temperature elevation, followed by electrophoresis. The DNA probes are thus separated and detected based on mobility differences. Qualitative and quantitative analyses are then carried out in order to investigate the types and amounts of mRNAs. The DNA probes are labeled via fluorophore 50, dye, radioactive element, chemiluminescent substance and the like.

Patent Claims

Claim 1. A method for analyzing nucleic acids, characterized by comprising a process wherein reagent containing multiple DNA probes having different respective mobilities is added to a sample containing multiple nucleic acids, so that the DNA probes with different respective mobilities hybridize to the aforementioned multiple nucleic acids, a process wherein excess DNA probe that has not hybridized to any of the nucleic acids is removed, a process wherein the DNA probes that have hybridized to the aforementioned nucleic acids are released from the nucleic acids, and a process wherein the DNA probes that have been released are separated and detected based on their different mobilities, where the types and amounts of the multiple nucleic acids are analyzed simultaneously.

Claim 2. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 1, characterized in that the aforementioned sample is obtained by using electrophoresis to fractionate nucleic acids in a specimen containing multiple nucleic acids to produce nucleic acids of different lengths.

Claim 3. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 1 or 2, characterized in that the separation carried out in the aforementioned process where the released DNA probes are separated and detected is carried out by electrophoresis using polyacrylamide gel as the electrophoresis medium.

Claim 4. The method for analyzing nucleic acids according to any one of Claims 1-3, characterized in that the DNA probes that have hybridized to the respective aforementioned multiple nucleic acids have been provided with different respective mobilities by means of varying their lengths.

Claim 5. The method for analyzing nucleic acids according to any one of Claims 1-3, characterized in that the DNA probes that have hybridized to the respective aforementioned multiple nucleic acids have been provided with different respective mobilities by means of changing their physical properties by chemical modification of said probes.

Claim 6. The method for analyzing nucleic acids according to any one of Claims 1-5, characterized in that the process whereby the DNA probes that have hybridized with the aforementioned multiple nucleic acids are separated from the nucleic acids is carried out by temperature elevation.

Claim 7. The method for analyzing nucleic acids according to any one of Claims 1-6, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with a radioactive element.

Claim 8. The method for analyzing nucleic acids according to any one of Claims 1-6, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with a fluorophore.



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

Claim 9. The method for analyzing nucleic acids according to any one of Claims 1-6, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with a dye.

Claim 10. The method for analyzing nucleic acids according to any one of Claims 1-6, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with a chemiluminescent substance.

Claim 11. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 7, characterized in that the radioactivity from the radioactive element used to label the aforementioned DNA probes is detected.

Claim 12. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 8, characterized in that the fluorescence from the fluorophore used to label the aforementioned DNA probes is detected.

Claim 13. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 9, characterized in that the light absorption due to the dye used to label the aforementioned DNA probes is detected.

Claim 14. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 10, characterized in that the chemiluminescence from the chemiluminescent substance used to label the aforementioned DNA probes is detected.

Claim 15. A method for analyzing nucleic acids, characterized by comprising a process wherein reagent containing multiple DNA probes having different respective mobilities is added to a sample containing multiple nucleic acids, so that the DNA probes having different respective mobilities hybridize to the respective aforementioned multiple nucleic acids, a process wherein excess DNA probes which have not hybridized to any of the nucleic acids are removed, a process wherein the sample obtained by the aforementioned processes is introduced into an electrophoresis medium and is separated by a first electrophoresis, a process wherein the DNA probes in the aforementioned electrophoresis medium that have hybridized respectively to the aforementioned nucleic acids are released from the respective aforementioned multiple nucleic acids, and a process wherein separation and detection are carried out by a second electrophoresis employing the differences in the mobilities of the DNA probes that have been released, where the types and amounts of multiple nucleic acids are analyzed simultaneously.

Claim 16. The nucleic acid analysis method according to Claim 15, characterized in that the electrophoresis medium used in the aforementioned first electrophoresis is agarose.

Claim 17. The nucleic acid analysis method according to Claim 15 or 16, characterized in that the aforementioned second electrophoresis is carried out using polyacrylamide as the electrophoresis medium.

Claim 18. The nucleic acid analysis method according to any of Claims 15-17, characterized in that the aforementioned DNA probes are separated and detected by means of two-dimensional electrophoresis.

Claim 19. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-18, characterized in that the aforementioned process whereby the excess DNA probe is removed comprises a process wherein the sample introduction opening in the aforementioned electrophoresis medium is sealed with a semipermeable film or second electrophoresis medium, and the sample is subjected to electrophoretic separation and reverse electrophoresis, thereby separating out the excess DNA probe by causing it to migrate into the aforementioned second electrophoresis medium or to pass through the aforementioned semipermeable film.

Claim 20. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-19, characterized in that the DNA probes which have hybridized to the respective aforementioned multiple nucleic acids have been provided with different respective mobilities by varying their lengths.

Claim 21. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-19, characterized in that the DNA probes which have hybridized to the respective aforementioned multiple nucleic acids have been provided with different mobilities by changing their physical properties through chemical modification of said probes.

Claim 22. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-21, characterized in that the aforementioned process whereby the DNA probes that have hybridized to the aforementioned nucleic acids are released from the nucleic acids is carried out by means of temperature elevation.

Claim 23. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-22, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with a radioactive element.

Claim 24. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-22, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with a fluorophore.

Claim 25. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-22, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with dye.

Claim 26. The nucleic acid analysis method according to any one of Claims 15-22, characterized in that the aforementioned DNA probes are labeled with a chemiluminescent substance.

Claim 27. The nucleic acid analysis method according to Claim 23, characterized in that the radioactivity from the radioactive element used to label the aforementioned DNA probes is detected.

Claim 28. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 24, characterized in that the fluorescence from the fluorophore used to label the aforementioned DNA probe is detected.

Claim 29. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 25, characterized in that the light absorption due to the dye used to label the aforementioned DNA probes is detected.

Claim 30. The method for analyzing nucleic acids according to Claim 26, characterized in that the chemiluminescence from the chemiluminescent substance used to label the aforementioned DNA probes is detected.

Detailed explanation of the invention

[0001]

Field of industrial application

The present invention pertains to a method for detecting the types and amounts of nucleic acids, particularly mRNA (messenger-RNA).



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

[0002]

Prior art

A blueprint of the activity of an organism is contained in its DNA. Organisms carry out various biological activities after having received external stimuli. Upon being stimulated, the mRNA which is associated with this activity first increases, and biological activity is then manifested when the corresponding proteins are produced. Specifically, active cells produce various types of mRNA in accordance with their state, and since the type and amount of mRNA in the cell is a fingerprint of the cellular activity, the condition of a cell or tissue can be apprehended by means of determining the types and amounts of its mRNA. Moreover, by investigating the mRNA and the proteins produced therefrom for various states, knowledge can be gained concerning biological control and treatment of illnesses. The establishment of a method for assaying mRNA types and amounts is thus extremely important from a practical standpoint; however, the analysis of mRNA in active cells is labor intensive, and requires a great deal of effort.

[0003]

In conventional techniques, methods have been employed whereby the proteins related to the phenomenon of interest are found, and the mRNAs that code for these proteins are then investigated. With this technique, DNA (or RNA) probes that hybridize to the mRNA of interest are employed, where the probes are provided with radioactive labels. By investigating the extent of increase or decrease in mRNA based on the various activity levels of the organism, suppositions can be made as to the role of the mRNA. However, mRNA assays are carried out by Northern blotting, where a complete mRNA extraction is performed from the organism, whereupon the mRNA is separated by agarose gel electrophoresis, and the pattern of the separated mRNA bands is transferred onto Nylon filter or the like. Next, a radioactively labeled DNA probe which hybridize to specific mRNAs is applied, and the mRNA is labeled when the probe hybridizes to the mRNA. Photosensitive film is then over-laid and the position of the tagged mRNA is transferred onto the photosensitive film. By then observing the bands, it can be determined whether or not there was an increase or decrease in the mRNAs of interest.

[0004]

Problems to be solved by the invention

With the aforementioned conventional technique, the presence or absence of mRNA is determined by whether or not the DNA probe hybridizes thereto, and thus only a single type of mRNA can be investigated in a single run. However, various mRNAs have interactive effects *in vivo* via the proteins that are produced therefrom, and for this reason, it is necessary for the mRNA content of the various mRNAs of each life cycle to be known in order to develop treatment guidelines or a diagnostic method for an illness based on an understanding of biological functioning. Specifically, it is necessary to simultaneously apprehend the changes in amounts of a few tens to a few hundreds of mRNAs, not just a single mRNA. The development of a technique that makes such an analysis possible is desirable.



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail japanese@aol.com

[0005]

The present invention, in response to this demand, has the objective of offering an mRNA analysis method whereby the types and amounts of mRNAs can be simultaneously investigated. The term "nucleic acid" is used in this specification as a term that includes both mRNA and its cDNA (complementary DNA).

[0006]

Means to solve the problems

In order to attain the objectives described above, the present invention involves the simultaneous analysis of a plurality of nucleic acids that are identified by first changing the mobilities of DNA probes that hybridize respectively to a plurality of target nucleic acids, specifically, mRNAs or cDNAs (complementary DNAs), so that the mRNAs can be identified by electrophoresis. The means whereby the mobilities of the DNA probes are varied can involve a method wherein the length of each of the probes is varied, or a method wherein the mobility of the probe as a whole is modified by bonding some of the phosphoric acid groups, base moieties or sugar moieties of the probe to a chemical substance that reacts with amino acids.

[0007]

The DNA probes which have hybridized to the nucleic acids are then collected, and the DNA probes which have hybridized respectively to a plurality of nucleic acids are then dissociated (released) from the nucleic acids by temperature elevation, followed by electrophoresis in order to separate and detect the DNA probes based on differences in their electrophoretic mobilities. By carrying out qualitative and quantitative analysis of these DNA probes, the types and amounts of nucleic acids present can be investigated.

[0008]

The nucleic acids can be used as-is in a mixture, or alternatively, the nucleic acids can be separated by length using agarose gel electrophoresis in order to prepare fractions. The DNA probes can then be allowed to hybridize and analysis can be carried out by the same procedure as described above. The multiple nucleic acids that have hybridized to multiple DNA probes, each having different mobilities, can then be separated by agarose gel electrophoresis, and the DNA probes that have hybridized to multiple nucleic acids can then be released from the respective multiple nucleic acids by heating. Then, by separating and assaying for the DNA probes based on their differences in electrophoretic mobilities, the size of the nucleic acids and the size of the DNA probes can be analyzed in two dimensions in order to investigate the types and amounts of nucleic acids that are present.

[0009]

Each of the DNA probes is labeled by a radioactive label, fluorophore, dye, chemiluminescent substance or the like. The DNA probes that have been separated by electrophoresis can be detected and identified by assaying for the radioactivity, fluorescence, light absorption or chemiluminescence in accordance with the means that was used to label each of the DNA probes.



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

[0010]

Action

Because the mobility differences of the hybridized DNA probes are employed in the identification of the types of nucleic acids, it is possible to use a few hundred probes, thus allowing for the single separation and assay of hundreds of nucleic acids. Fluorophores also can be used to label the DNA probes, and by varying the type of fluorophore and thus the emitted wavelength, DNA probes numbering near a thousand can be produced by using a combination of two elements: the length of the DNA probes and the type of fluorophore (fluorescence wavelength). These different DNA probes are then allowed to hybridize to the respective multiple nucleic acids that are their targets, whereupon only those DNA probes that have hybridized to the nucleic acids are collected. Then, by releasing the DNA probes from the nucleic acids through temperature elevation and carrying out a single separatory assay for the DNA probes by means of electrophoresis, it is possible to simultaneously determine the types and amounts of the nucleic acids.

[0011]

Embodiments

An application example of the present invention is described below using Figures 1-3. The following explanation is the same whether the target of analysis is mRNA or cDNA.

Embodiment 1

Magnetic beads having polythymine oligomers (dT)_n were used for collecting mRNA from cells. The details of this procedure are described in the Technical Handbook, Molecular Biology (Dynabeads biomagnetics separation system) or in Nucleic Acids Research **18**, 3669 (1990). Microtiter plates with polythymine oligomers (dT)_n supported on their surfaces can also be used (Nature **357**, 519 (1992)). A flow chart is shown in Figure 1 pertaining to the preparation of the mRNA samples. As shown in Figure 1, mRNAs 1-3 have polyadenine oligomers (dA)_n 4 at their 3' terminals, and when the magnetic beads 5 having six polythymine oligomers (dT)_n chains are added to the biological sample and mixed, the adenine chains and the thymine chains hybridize, so that the mRNA is bound to the magnetic beads 5 as indicated by 7-9. This reaction is carried out in solution. The magnetic beads 5 are then held in a region of the vessel 10 using a magnet 12, and the inside of the vessel is washed, thereby removing all matter other than the mRNA. The content of the solution obtained in this manner is almost all mRNA, and this solution is used as sample.

[0012]

In this embodiment, 0.1 mg of magnetic beads with attached polythymine oligomer (dT)₂₆ was used, and the mRNA in the biological sample was separated by hybridization. The total amount of mRNA attached to the magnetic beads was 0.2 µg. Taking the average chain length of the mRNA as 2 kb, this amount corresponds to 2×10^{11} molecules. The copy number of each mRNA contained therein is 10^7 - 10^8 molecules or less.



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

[0013]

As shown in Figure 2, DNA probes which will hybridize to the mRNA to be analyzed were selected from a cDNA (complementary DNA) database as shown in Figure 2, and the DNA probes were prepared by adjusting the constitutive base length and linker length so that the electrophoresis rate (mobility) of each of the mRNAs was different. By this means, it was possible to use electrophoretic separation to identify which of the detected DNA probes had hybridized to which of the mRNAs.

[0014]

The DNA probes can be labeled using ^{32}P radioactive isotope, but in this example, a description will be presented for a case where a fluorescent marker was used and the DNA probes were labeled with fluorophores. The 5' terminals of the DNA probes were bonded to FITC fluorophores (fluorescein isothiocyanate: fluorescent wavelength 515 nm) via amino acids. About 300 DNA probes were used in six groups that consisted of 50 DNA probes, each having electrophoretic rates that differed by about two bases, with the lengths of the DNA probes being 20 to 120 bases long. As the lengths increased, a technique was used wherein inosine or the like was included so that the stability of the hybridomers would not vary greatly. These probe sets are referred to as probe sets 1-6. In order to simplify the description, Figure 2 presents only the case where probe set 1 is used.

[0015]

The amount of each probe in the DNA probe sets was 1 fmol (femtomole). The sample was divided into six equivalent portions as shown in Figure 2, and probe set 1 to probe set 6 was added to each of the portions, thereby bringing about probe hybridization. A magnet 12 was then used to immobilize the magnetic beads, the mRNA attached thereto, and the fluorescently labeled DNA probes that were hybridized to the mRNAs, in a region of the vessel 10, and the excess DNA probe was washed away. In this procedure, the fluorescently labeled probes were bound to the mRNAs that were trapped by the magnetic beads, as indicated in 101-103.

[0016]

Next, as shown in Figure 3, the probes having different lengths that were bound to the mRNAs were electrophoretically separated and analyzed. The DNA probes that had hybridized to the mRNA were transferred, along with the magnetic beads, into the upper end of the capillary gel 201. Upon introducing sample solution into the upper end 202 (negative electrode vessel, also used as part for sample addition) of the funnel-shaped capillary, and the DNA probes and magnetic beads 210 both sedimented onto the upper end of the capillary. The magnetic beads 210 were then localized in the upper end using a magnet 205, and this region was then heated to 90-100°C with a heater 206 so that the DNA probes dissociated. An electrophoretic voltage was then applied to both ends of the capillary gel 201 so that the dissociated DNA probes 51-53 migrated downwards. The DNA probes could then be respectively separated because the probes had different electrophoretic mobilities in accordance with the type of mRNA.

[0017]

The gel used for separation contained 3 wt% cross-linker and 6 wt% polyacrylamide (6%T, 3%C), which is the same type of gel used in DNA base sequencing (Analytical Chemistry 62, 900



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

(1990)). The gel length for separation was 25 cm, and at this length it was possible to achieve separation based on a single base difference for lengths of up to 400 bases. The locations at which the DNA probes separated were measured by the fluorescence generated when laser light was used to irradiate the bottom of the gel capillary or the region over which the DNA probes separated during sheath flow. The apparatus described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) No. Hei 3[1991]-234427 can be used as the fluorescence measurement system. In the embodiment of Figure 3, the fluorescently labeled DNA probes that were eluted from the capillary gel 201 were drawn downwards towards the positive electrode container 209 by means of the sheath solution, and during this time, the labeled fluorophores of the probes were excited using laser light that was incident at a location about 0.5 mm below the end of the capillary gel 201 from a direction perpendicular to the paper surface (for purposes of simplification, the laser 207 is indicated in the plane of the paper in the figure). The fluorescence given off from the fluorophore labels was detected with a detector 208 via a lens system and a filter system that are not shown in the figure. The strength of the detected fluorescence corresponded to the amount of mRNA hybridized to the DNA probes.

[0018]

Although FITC was used as the fluorophore 50 in this example, TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate (fluorescent wavelength 575 nm)) or sulforhodamine 101 (fluorescence wavelength 615 nm) can also be used. Moreover, by performing labeling with fluorophores having different fluorescence wavelengths and using different DNA probe lengths in combination, a few hundred probes can be detected at one time.

[0019]

The mRNA is much longer (on average, 2 kb) than the DNA probe, and so it accumulates at the vicinity of the upper end of the gel during electrophoresis. Consequently, after all of the probes have been eluted from the bottom end, the mRNA can be electrophoresed in the reverse direction, trapped again using the magnetic beads, and then subjected to assay a second time using a different probe set. By this means, numerous mRNAs can be analyzed from a small number of samples. Although mRNA was directly investigated in this procedure, the same analysis can be carried out on cDNA produced from the mRNA, which has better stability.

[0020]

Embodiment 2

Although mRNA was used in a mixture without modification in the previous embodiment, in this example mRNA was separated on the basis of length, and was then analyzed by hybridization with the DNA probes. Specifically, mRNA that had been trapped with magnetic beads was released by heating, and was then separated by agarose gel electrophoresis. In this procedure, a short tubular gel can be used to fractionate the eluted mRNA, or the mRNA can be maintained in a separated state in a long gel, and the gel can then be excised in order to produce fractions of mRNA, each having a different length.



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

[0021]

The various fractions produced in this manner were each used as samples, and analysis was carried out in the same manner as in the previous embodiment using probe sets. Magnetic beads having polythymine oligomers (dT)_n and DNA probe sets were added to each of the fractions, thereby bringing about hybridization, whereupon the excess DNA probes, etc. were removed by washing. Next, as shown in Figure 3, the DNA probes contained in each of the samples were dissociated by heating, and the DNA probes in each of the fractions were separated on the basis of length utilizing their different electrophoretic distances.

[0022]

According to this embodiment, two-dimensional analysis can be carried out using mRNA size and DNA probe size, thus it is possible to measure a few thousand mRNAs in a single run. In this case, if one probe hybridizes to a plurality of mRNAs, then a large number of mRNAs can be analyzed with a small number of probes, and moreover, the mRNA to which the probe has hybridized can be determined from two sets of information pertaining to probe length and messenger² length.

[0023]

In this embodiment, a gel electrophoresis device comprising a plurality of gel capillaries as described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) No. Hei 3[1991]-234427 was used in order to increase analytical throughput. Fluorescence measurements can be carried out simultaneously using such devices as a line sensor, a diode array with associated image amplifier, or a CCD detector.

[0024]

Embodiment 3

In Embodiment 2 above, mRNA was fractionated based on size, but separation and measurement can also be carried out by two-dimensional electrophoresis without performing fractionation. This procedure involves first trapping the mRNA using magnetic beads as shown in Figure 1 above, followed by purification. Next, the temperature was increased in order to release the hybridized adenine-thymine chains (polythymine oligomer-polyadenine oligomer hybridization), whereupon the magnetic beads alone were removed to obtain the mRNA. The DNA probes were then added and allowed to hybridize to the mRNA, and the resulting mixture was introduced into a capillary gel (1% agarose) with an inner diameter of about 0.5-1 mm.

[0025]

The top of the introduction opening of the capillary gel was then sealed with a 10 mm length of polyacrylamide gel (8%T, 3%C) or a semipermeable membrane, and electrophoresis was carried out in a direction opposite to normal electrophoretic separation (towards the polyacrylamide gel or semipermeable membrane). During this electrophoresis, the free DNA probes moved much faster than the hybridized DNA probes, so that they passed through the polyacrylamide gel or semipermeable

² ILS Note - sic.

membrane and were removed in 1-5 minutes. On the other hand, the hybridized DNA probes and mRNA remained at the gel surface or in the gel. The hybridomers were then separated by applying an electric field in the normal separatory direction.

[0026]

After performing electrophoresis for a determined period of time, the tube gel was removed, and two-dimensional separation was carried out by placing the gel on a polyacrylamide gel plate. This two-dimensional separation can be carried out using the apparatus described in U.S. Patent No. 4305799 or other similar apparatus. Specifically, the tube-shaped gel is heated to dissociate the DNA probes from the mRNA, whereupon the DNA probes are electrophoresed in a direction orthogonal to the tube gel. The types of mRNA to which the DNA probes have hybridized can then be determined from the DNA probe length and the mRNA size determined from the horizontal position, and the amount of mRNA can be determined from the amount of DNA probe detected.

[0027]

In each of the embodiments described above, a description was presented for a case where fluorescent labels were used, but labeling can also be performed with a dye having a color such as silver, a radioactive element such as ^{32}P , peroxidase, luminol, digoxigen³ or other chemiluminescent substances. When a dye is used for the label, light absorption is employed as the detection means, and when a radioactive element or chemiluminescent substance is used, a technique is employed wherein the dissociated DNA probes are held in the gel, where after adding a luminescence reagent for chemiluminescent substances, the pattern is transferred to a photosensitive film.

[0028]

Effect of the invention

By means of the present invention as described above, numerous DNA probes can be simultaneously analyzed based on differences in electrophoresis rates of DNA probes which have hybridized to the mRNA. The types and amounts of multiple mRNAs can thus be determined simultaneously by this means.

Brief description of the drawings

Figure 1. Diagram showing how the mRNA samples are prepared.

Figure 2. Flow chart showing how the label probes are bound to mRNA that has been trapped on magnetic beads.

Figure 3. Schematic diagram describing separation and analysis of each probe by means of electrophoresis.

³ ILS Note - sic.



Keyed legends:

1, 2, 3	mRNA
4	Polyadenine
5	Magnetic beads
6	Polythymine oligomer
7,8,9	mRNA trapped on magnetic beads
10	Vessel
11	Reaction liquid
12	Magnet
13	Magnetic beads
50	Fluorophore
51,52,53	Dissociated fluorescently labeled probes
101,102,103	Fluorescently labeled probes bound to mRNA trapped by magnetic beads
201	Capillary gel
202	Negative electrode chamber also functioning as a funnel-shaped sample introduction part
205	Magnet
206	Heater
207	Laser oscillator
208	Detector
209	Positive electrode chamber
210	Magnetic beads
211	Reaction liquid

Figure 1

1	nth mRNA
2	+ unreacted materials
3	Magnetic beads held with a magnet
4	Washing
5	Unreacted materials
6	nth mRNA
7	mRNA sample suspension

Figure 2

1	mRNA sample suspension
2	Six equivalent portions
3	Probe sets 2-6 added
4	Probe set 1
5	Added
6	50 th probe
7	Capture of magnetic beads with magnet
8	Washing
9	Removal
10	Excess probe
11	m th fluorescently labeled probe



InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

Figure 3

- 1 Sample added
- 2 Sheath liquid
- 3 mth probe
- 4 Sheath liquid

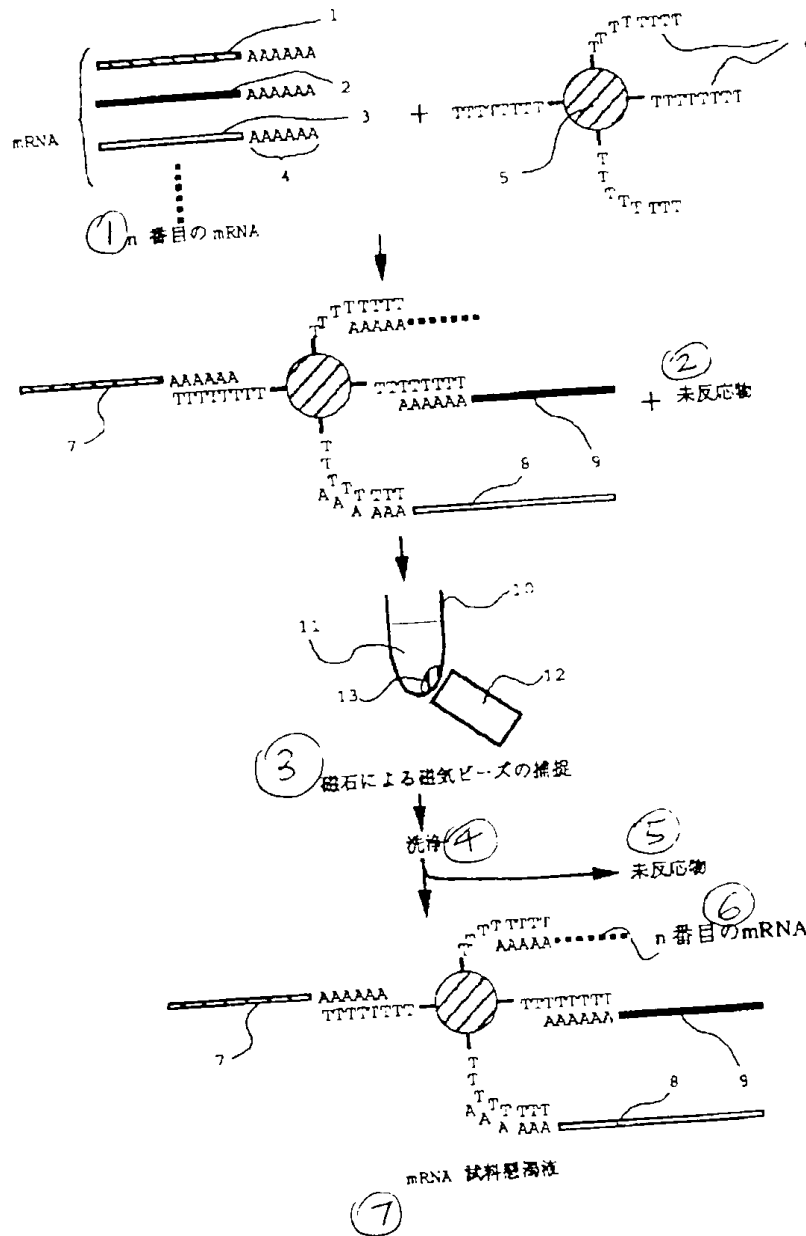


InterLingua
Linguistic Services, Inc.
(310)792-3636/Fax(310)792-3642
E-mail: japanese@aol.com

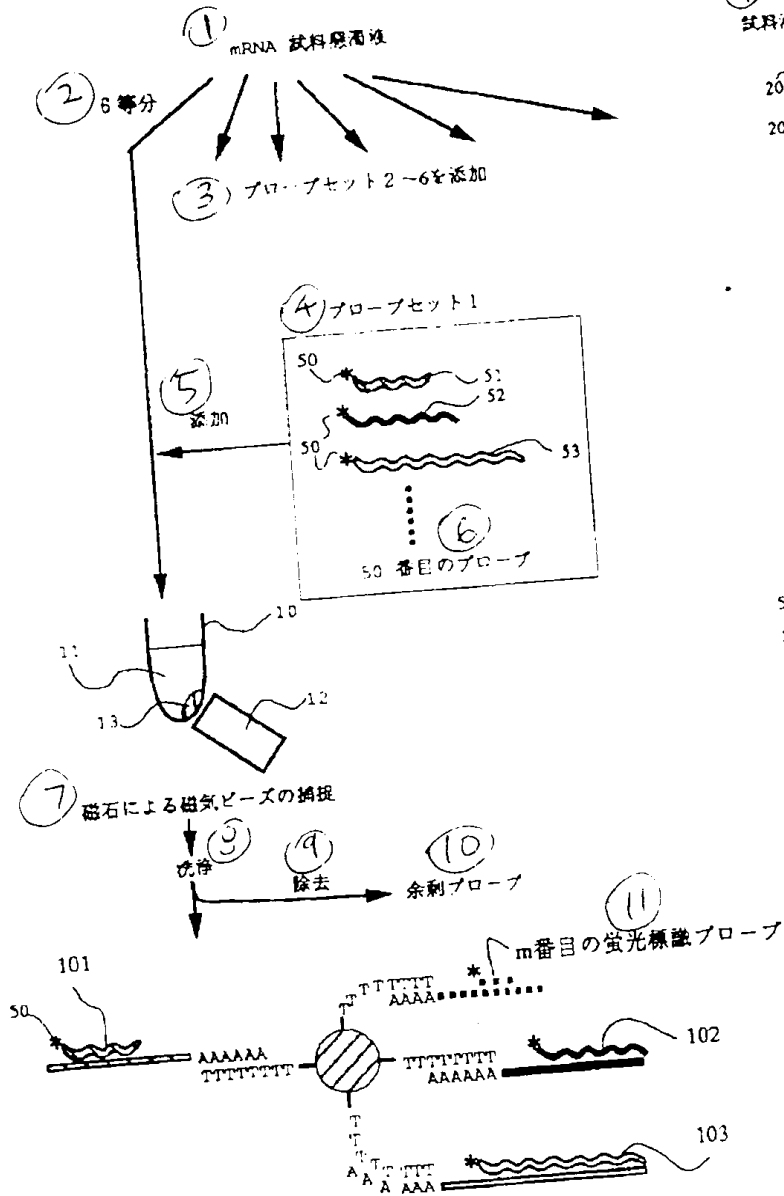
(7)

kered figures

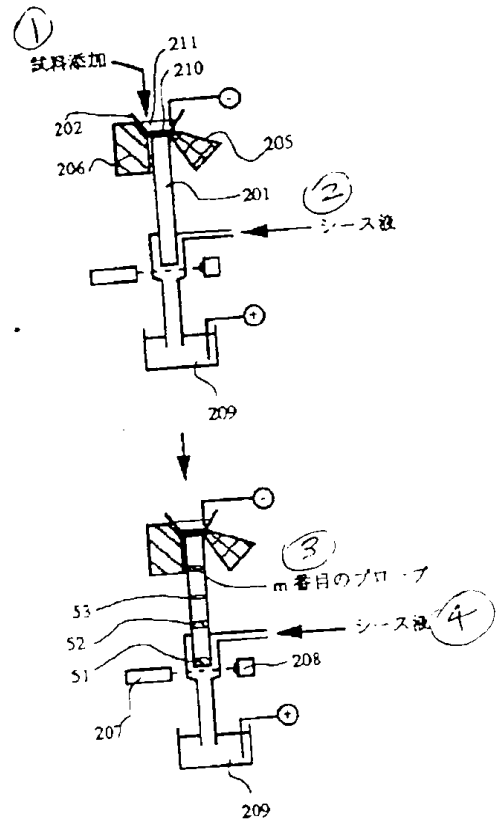
【図1】



【図2】



【図3】

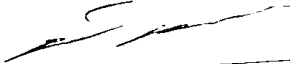


フロントページの続き

(72) 発明者 古山 宏子
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内

CERTIFICATION

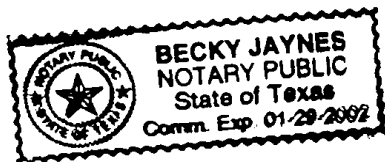
I, Matthew Bramble, hereby declare that I am a professional translator experienced in translating Japanese technical documents/patents, and that the foregoing is a true and accurate translation of the Japanese patent, 6-294796, Nucleic Acid Analysis Method, by Hideki Kamihara et al., to the best of my knowledge.



Matt Bramble

STATE OF TEXAS
County of Travis

Subscribed and sworn to before me, a Notary Public, in and for the State
of Texas this 8th day of December 1998.





Notary Public

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-294796

(43) 公開日 平成6年(1994)10月21日

(51) IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/50		P 7055-2 J		
27/447				
33/58	A 7055-2 J			
// C 1 2 Q 1/68	A 7823-4 B			
	7363-2 J			
			G 0 1 N 27/ 26	3 1 5 Z
			審査請求 未請求	請求項の数30 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-84433

(22) 出願日 平成5年(1993)4月12日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 発明者 岡野 和宜

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 発明者 川本 和子

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔

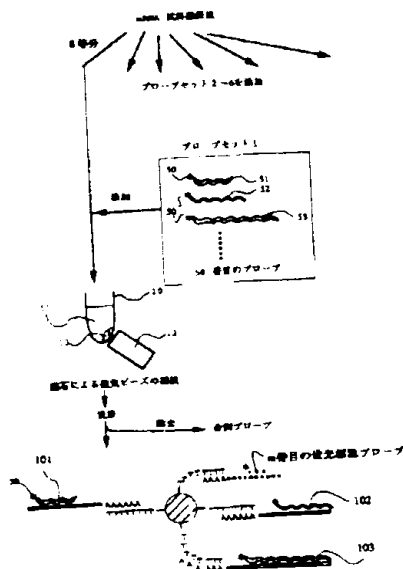
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分析方法

(57) 【要約】

【目的】 複数のmRNAの種類と存在量を同時に分析する。

【構成】 目的とする複数のmRNAの各々にハイブリダイズさせるDNAプローブ101、102、103の長さを変えてDNAプローブの移動度を変化させ、電気泳動により識別できるようにして、複数のmRNAを識別し同時分析する。mRNAにハイブリダイズしたDNAプローブだけを取りだし、複数のmRNAの各々にハイブリダイズしたDNAプローブを昇温により遊離せしめた後、電気泳動し移動度の差によりDNAプローブを分離検出し、定量と定性分析を行ない、mRNAの種類と存在量を調べる。DNAプローブは蛍光体50、色素、放射性元素、化学発光物質等で標識される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数の核酸を含む試料にそれぞれ移動度の異なる複数のDNAプローブを含む試薬を加えて前記複数の核酸の各々にそれぞれ移動度の異なるDNAプローブをハイブリダイズさせる工程と、

いずれの核酸にもハイブリダイズしていない余剰のDNAプローブを除去する工程と、

前記核酸にハイブリダイズしたDNAプローブを核酸から遊離させる工程と、
遊離したDNAプローブをその移動度の差を利用して分離検出する工程とを含む複数の核酸の種類と量を同時に分析することを特徴とする核酸分析方法。

【請求項2】 前記試料は複数の核酸を含む検体中の核酸を電気泳動によって長さの異なる核酸毎に分画して得られたものであることを特徴とする請求項1記載の核酸分析方法。

【請求項3】 前記遊離したDNAプローブを分離検出する工程における分離はポリアクリルアミドゲルを電気泳動媒体とする電気泳動によることを特徴とする請求項1又は2記載の核酸分析方法。

【請求項4】 前記複数の核酸の各々にハイブリダイズさせるDNAプローブはその長さを変えることによってそれぞれ移動度を異ならせたものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項5】 前記複数の核酸の各々にハイブリダイズさせるDNAプローブは該プローブを化学的に修飾する物質を変えることによってそれぞれ移動度を異ならせたものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項6】 前記核酸にハイブリダイズしたDNAプローブを核酸から遊離させる工程は昇温によるものであることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項7】 前記DNAプローブは放射性元素で標識されていることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項8】 前記DNAプローブは蛍光体で標識されていることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項9】 前記DNAプローブは色素で標識されていることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項10】 前記DNAプローブは化学発光物質で標識されていることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項11】 前記DNAプローブに標識された放射性元素からの放射線を検出することを特徴とする請求項7記載の核酸分析方法。

【請求項12】 前記DNAプローブに標識された蛍光体からの蛍光を検出することを特徴とする請求項8記載

の核酸分析方法。

【請求項13】 前記DNAプローブに標識された色素による光吸収を検出することを特徴とする請求項9記載の核酸分析方法。

【請求項14】 前記DNAプローブに標識された化学発光物質からの化学発光を検出することを特徴とする請求項10記載の核酸分析方法。

【請求項15】 複数の核酸を含む試料にそれぞれ移動度の異なる複数のDNAプローブを含む試薬を加えて前記複数の核酸の各々にそれぞれ移動度の異なるDNAプローブをハイブリダイズさせる工程と、
いずれの核酸にもハイブリダイズしていない余剰のDNAプローブを除去する工程と、

前記工程を経た試料を電気泳動媒体に注入して第1の電気泳動により分離する工程と、

前記複数の核酸の各々にハイブリダイズした前記電気泳動媒体中のDNAプローブを前記複数の核酸の各々から遊離させる工程と、

遊離したDNAプローブをその移動度の差を利用して第2の電気泳動により分離検出する工程とを含む複数の核酸の種類と量を同時に分析することを特徴とする核酸分析方法。

【請求項16】 前記第1の電気泳動の電気泳動媒体はアガロースであることを特徴とする請求項15記載の核酸分析方法。

【請求項17】 前記第2の電気泳動はポリアクリルアミドを電気泳動媒体として行われることを特徴とする請求項15又は16記載の核酸分析方法。

【請求項18】 前記DNAプローブを2次元電気泳動により分離検出することを特徴とする請求項15～17のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項19】 前記余剰のDNAプローブを除去する工程は、前記電気泳動媒体の試料注入口を第2の電気泳動媒体又は半透膜で封じ、試料の電気泳動分離と逆方向に電気泳動させることによって余剰のDNAプローブを前記第2の電気泳動媒体中に泳動させ又は前記半透膜を透過させることによって分離除去する工程を含むことを特徴とする請求項15～18のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項20】 前記複数の核酸の各々にハイブリダイズさせるDNAプローブはその長さを変えることによってそれぞれ移動度を異ならせたものであることを特徴とする請求項15～19のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項21】 前記複数の核酸の各々にハイブリダイズさせるDNAプローブは該プローブを化学的に修飾する物質を変えることによってそれぞれ移動度を異ならせたものであることを特徴とする請求項15～19のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項22】 前記核酸にハイブリダイズしたDNA

3
プローブを核酸から遊離させる工程は昇温によるものであることを特徴とする請求項15～21のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項23】 前記DNAプローブは放射性元素で標識されていることを特徴とする請求項15～22のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項24】 前記DNAプローブは蛍光体で標識されていることを特徴とする請求項15～22のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項25】 前記DNAプローブは色素で標識されていることを特徴とする請求項15～22のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項26】 前記DNAプローブは化学発光物質で標識されていることを特徴とする請求項15～22のいずれか1項記載の核酸分析方法。

【請求項27】 前記DNAプローブに標識された放射性元素からの放射線を検出することを特徴とする請求項23記載の核酸分析方法。

【請求項28】 前記DNAプローブに標識された蛍光体からの蛍光を検出することを特徴とする請求項24記載の核酸分析方法。

【請求項29】 前記DNAプローブに標識された色素による光吸収を検出することを特徴とする請求項25記載の核酸分析方法。

【請求項30】 前記DNAプローブに標識された化学発光物質からの化学発光を検出することを特徴とする請求項26記載の核酸分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は核酸、特にmRNA（メッセンジャーRNA）の種類と量を検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 生体の活動の青写真はDNA中に書き込まれている。生体は外部刺激等を受けて種々の生体活動を行うが、その際その活動に関与するmRNAがまず増加し、それに対応した蛋白が生成されて生体活動が実行される。すなわち活動中の細胞は状況に応じて種々のmRNAを作り出しており、細胞中のmRNAの種類と量は細胞活動のフィンガープリントのようなもので、mRNAの種類と量を知ることにより細胞あるいは組織の状態を把握することができる。また、種々の状態を支配しているmRNA及びそれが作り出す蛋白質を知ることにより、病気の治療や生体コントロールに関する知見を得ることができ、応用の点からしてもmRNAの種類と量を検出する方法を確立することは重要である。しかし、活動中のmRNAを分析するのは手間がかかり大変な労力を必要とする。

【0003】 従来法では注目事象に関連する蛋白質を捉え、これをコードするmRNAを調べる方法が取られて

いた。この方法によると、注目するmRNAにハイブリダイズするDNA（あるいはRNA）プローブを製作する。プローブには放射性標識が付けられている。そして、mRNAが生体の種々の活動過程でどのように増減するかを調べて、その役割を推定するが、mRNAの検出にはノーザンブロットが用いられる。すなわち、生体から抽出したすべてのmRNAをアガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロンフィルター等に分離したmRNAのパターンを転写する。次いで、特定のmRNAにハイブリダイズする放射性標識されたDNAプローブをふりかけて目的とするmRNAにハイブリダイズさせ、そのmRNAを標識する。その後、感光フィルムで覆って標識mRNAの位置を感光フィルムに転写し、それを調べることにより目的とするmRNAの有無あるいは増減などを調べていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 前記従来法は、mRNAの有無の調査をDNAプローブがハイブリダイズしたかどうかで行うため、一度に一種類のmRNAしか調べることができなかった。しかし、生体中では種々のmRNAがそれを基に生成される蛋白質を通して相互に影響しながら働いている。このため生体機能を理解し、病気の治療指針や診断法を開発するには、各生活サイクルの中で種々のmRNAの存在量を知る必要がある。すなわち単一のmRNAだけでなく数十あるいは数百のmRNAの存在量の変化を同時に捉える必要があり、これを可能とする手法の開発が望まれている。

【0005】 本発明は、このような要請に応じてmRNAの種類と存在量を同時に調べることができるmRNA分析方法を提供することを目的とする。なお、本明細書ではmRNAとそのc-DNA（相補DNA）を共に含む用語として「核酸」という用語を用いる。

【0006】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するため本発明では、目的とする複数のmRNAまたはc-DNA（相補DNA）すなわち核酸の各々にハイブリダイズさせるDNAプローブの移動度を変化させ、電気泳動により識別できるようにして、複数の核酸を識別し同時に分析する。DNAプローブの移動度を変化させる手段としては、プローブの長さをそれぞれ変えることによって、プローブのリン酸基あるいは塩基部分、糖部分の一部にアミノ基と反応する化学物質を結合させてプローブ全体としての移動度を変化させることによって、リンカー部分の長さを変えることによってよい。

【0007】 核酸にハイブリダイズしたDNAプローブだけを取りだし、複数の核酸の各々にハイブリダイズしたDNAプローブを複数の核酸の各々から昇温により核酸から脱離（遊離）せしめた後、電気泳動させ移動度の差によりDNAプローブを分離検出し、これらDNAプ

5
ロープの定量と定性分析を行うことにより核酸の種類と存在量を調べる。

【0008】核酸は混合物のまま用いてもよいが、アガロースゲル電気泳動で核酸を長さ分離して分画してからDNAプローブをハイブリダイズさせ、前記と同様の手順で分析することもできる。また、それぞれ移動度の異なる複数のDNAプローブをハイブリダイズさせた複数の核酸をアガロースゲル電気泳動によって分離し、次いで複数の核酸にハイブリダイズしたDNAプローブを複数の核酸の各々から昇温により遊離せしめた後、電気泳動させ移動度の差によりDNAプローブを分離検出することにより、核酸のサイズとDNAプローブのサイズによって2次元的に分析を行い、核酸の種類と存在量を調べる。

【0009】各DNAプローブは放射性標識物、蛍光体、色素、化学発光物質等で標識される。電気泳動分離されたDNAプローブは、各DNAプローブに標識された標識物による放射線、蛍光、光吸収、化学発光等を検出することによって検出、識別される。

【0010】

【作用】核酸の種類を識別するのにハイブリダイズしたDNAプローブの泳動速度の差を利用するので、数百のプローブ、したがって数百の核酸を一度に分離検出することができる。また、DNAプローブの標識を蛍光体で行ない、蛍光体の種類を変えその発光波長を変化させることにより、DNAプローブの長さや蛍光体の種類（発光波長）の2つの要素の組合せで1000近い数のDNAプローブを作ることができ、これら異なるDNAプローブを目的とする複数の核酸の各々にハイブリダイズさせ、核酸にハイブリダイズしたDNAプローブだけを取りだし、昇温によりDNAプローブを核酸から遊離させ電気泳動によりDNAプローブを一度に分離検出するので、核酸の種類と存在量とを同時に知ることができる。

【0011】

【実施例】本発明の実施例を図1から図3を用いて説明する。なお、以下の説明は分析対象をmRNAとして行うが、分析対象がc-DNAであっても同様である。

実施例1) mRNAを細胞から取り出すにはポリチミンオリゴマー(dA)・をもつ磁気ビーズを使用する。その手順の詳細は、テクニカル・ハンドブック、モレキュラ・バイオロジィ(ダイナビーズ・バイオマグネティック・セパレーション・システム)(Technical handbook, Molecular Biology (Dyna beads biomagnetic separation system))、あるいはスクレイック・アシッド・リサーチ、第18巻、3669頁、1990年(Nucleic Acid Research 18, 3669 (1990))に記載の通りである。また、ポリチミンオリゴマー(dT)・を表面に保持したマイクロタイタープレートを用いてもよい(ネーチャー、第357巻、519頁、1992年(Nature 357, 519 (1992)))。図1

に、mRNA試料の調製フローを示す。図1に示すように、mRNA 1~3は3'末端にポリアデニンオリゴマー(dA)・、4をもつ。生体試料中にポリチミンオリゴマー(dT)・、6をもつ磁気ビーズ5を加えて混合すると、アデニン鎖はチミン鎖とハイブリダイズするために、mRNAは磁気ビーズ5と7~9のように結合する。この反応を溶液で行った後、磁気ビーズ5をマグネット12によって容器10の一部に固定し、容器内部分を洗浄するとmRNA以外のものを除去することができる。こうして得られた溶液にはほとんどすべてのmRNAが含まれており、それを試料として用いる。

【0012】本実施例では、0.1mgのポリチミンオリゴマー(dT)・付きの磁気ビーズを用い生体試料中のmRNAをハイブリダイズさせて分離したが、磁気ビーズに付着するmRNAの量は高々約0.2μgである。mRNAの平均鎖長を2K塩基とするとこれは約2×10¹¹分子に相当する。この中に含まれる各mRNAのコピー数は10¹~10⁴分子以下である。

【0013】次に図2に示すように、c-DNA(相補DNA)データベースから分析しようとするmRNAにハイブリダイズするDNAプローブを選びだす。DNAプローブは、構成する塩基の長さやリンカーの長さを調節し各mRNAに対応してゲル電気泳動速度(移動度)が異なるようにしてあり、電気泳動分離することにより、計測されたDNAプローブがどのmRNAにハイブリダイズしたのか識別できるようにしてある。

【0014】DNAプローブは³²Pなど放射性同位元素を用いて標識してもよいが、ここではDNAプローブを蛍光体で標識する蛍光標識を例にとって説明する。例えば、DNAプローブの各々の5'末端にアミノ基を介して蛍光体FITC(フルオレセイン・イソチオシアネート; 発光波長515nm)を結合させる。DNAプローブとして300程使用したが、泳動速度が約2塩基分異なる50種のDNAプローブからなるグループを6組作製して用いた。DNAプローブの長さは20塩基から120塩基まであり、長くなるにつれイノシンなどを入れてハイブリドマーの安定度が極端に異ならないように工夫している。以後これらをプローブセット1~プローブセット6と呼ぶ。図2には、説明の簡略化のためプローブセット1を使用した場合についてのみ示した。

【0015】DNAプローブセット中の各プローブの量は1fmol。(フェムトモル)とした。試料を図2のように6等分し、各分画にプローブセット1~プローブセット6を加えてプローブをハイブリダイズさせる。次いで磁石12を用いて磁気ビーズとそれに付着したmRNA、さらにmRNAにハイブリダイズした蛍光標識DNAプローブを容器10の一部に固定し余剰のDNAプローブを洗浄・除去する。この操作で101~103のよう磁気ビーズが捕捉したmRNAに蛍光標識プローブが結合する。

【0016】次に図3のようにして、mRNAに結合した長さの異なるプローブを電気泳動で分離分析する。mRNAにハイブリダイズしたDNAプローブは、磁気ビーズごと分離用のキャピラリーゲル201の上端部にのせられる。ロータ状のキャピラリー上部（試料添加部兼負電極槽）202に試料液を注入すると、DNAプローブは磁気ビーズ210と共にキャピラリー上端部に沈んでいく。磁石205を用いて磁気ビーズ210を上端部に局在化させた後、この部分を加熱器206で90〜100℃に加熱してDNAプローブを脱離させる。キャピラリーゲル201の両端には泳動電圧がかけられており、脱離したDNAプローブ51〜53は下方へ泳動していくが、DNAプローブは対応するmRNAの種類に応じて異なる泳動速度を有するので各プローブを分離することができる。

【0017】分離に用いるゲルは架橋剤を3重量%含む6重量%のポリアクリルアミド（6%T、3%C）で、DNA塩基配列決定に用いるのと同じものである（アナリティカル・ケミストリ、第62巻、900頁、1990年（Analytical Chemistry 62, 900 (1990)））。分離部のゲル長は25cmで400塩基長まで1塩基の分離が可能である。ゲルキャピラリーの下端あるいは、スフロー中にDNAプローブを抜き出した所をレーザー照射して発する蛍光を計測する。蛍光の測光系は、例えば特願平3-234427号に記載のものを用いることができる。図3の実施例では、キャピラリーゲル201から溶出した蛍光標識DNAプローブはシーフ液によって下方の正電極槽209に運ばれるが、その途中で紙面垂直方向からキャピラリーゲル201の末端下方約0.5mmの位置に照射されるレーザー光（図では簡単のため、レーザー207を紙面内に図示している）によってプローブの標識蛍光体が励起される。標識蛍光体から発せられた蛍光は、図示しないレンズ系、フィルター系を介して検出器208で検出される。検出された蛍光強度は、そのDNAプローブにハイブリダイズするmRNAの量に対応する。

【0018】ここでは蛍光体50としてFITCを用いたが、FRET（テトラメチルローダミン・イソチオシアネート（発光波長575nm）や、スルフォローダミン101（発光波長615nm）を用いてもよい。更に、発光波長の異なる蛍光体による標識とDNAプローブ長を組み合わせることで一度に数百のプローブを検出することもできる。

【0019】電気泳動の際にmRNAは、DNAプローブに比較してはるかに長い（平均2K塩基）ためゲルの上部近傍に留まっている。したがって、すべてのプローブが下端から溶出した後、逆方向にmRNAを泳動させて再び磁気ビーズにトラップし、別のプローブセットで再度検出を試みることもできる。この場合、少ない試料で多くのmRNAを分析することができる。ここでは

mRNAを直接調べたが、mRNAをmRNAより安定性のよいc-DNAに直して同様の分析を行うこともできる。すなわち、磁気ビーズに付着したポリチミンオリゴマーをプライマーとして相補鎖合成を行い、磁気ビーズに付着したc-DNAを得た後に計測することもできる。

【0020】（実施例2）前記実施例ではmRNAは混合物のまま用いたが、mRNAを長さで分離してからDNAプローブをハイブリダイズさせて分析することもできる。すなわち、磁気ビーズで捕捉したmRNAを熱脱離させた後、アガロースゲル電気泳動分離する。その後、短いチューブ状のゲルを用いて溶出してくるmRNAを分画するか、長いゲル中に分離した状態で保持し、その後ゲルを切り出して長さの異なるmRNA毎の分画を作る。

【0021】このようにして作られた各分画をそれぞれ試料とし、プローブセットを用いて前記実施例と同様の方法で分析を行う。各分画にポリチミンオリゴマー（dT）をもった磁気ビーズとDNAプローブセットを加えてハイブリダイズさせ、余剰のDNAプローブ等を洗浄して除去する。次に図3で説明したように、各分画に含まれるDNAプローブを加熱脱離させ、各分画毎に異なる泳動路を用いてDNAプローブを長さで分離する。

【0022】本実施例によると、mRNAのサイズとDNAプローブのサイズを用いて2次元的に分析できるので、数千のmRNAの分析を一度に行うことができる。このとき、1つのプローブが複数のmRNAとハイブリダイズするようにしておくと、少ない数のプローブで多くのmRNAを分析することができ、しかもプローブの長さやメッセージャーの長さの2つの情報からそのプローブがハイブリダイズしたmRNAを確定することができるのである。

【0023】本実施例においては、分析のスループットを上げるため、前記特願平3-234427号に記載した複数のゲルキャピラリーを含むゲル電気泳動装置を用いて複数の分画を同時に電気泳動させ、ラインセンサー、イメージ増幅器付ダイオードアレー、あるいはCCD検出器等を用いて同時に蛍光測光するようにしてもよい。

【0024】（実施例3）前記実施例2ではmRNAをサイズ分画したが、分画せずに2次元電気泳動で分離計測することもできる。その手順を説明すると、まず図1に示したように磁気ビーズを用いてmRNAを捕捉し、複製する。次いで昇温してハイブリダイズしたアデニン・チミン鎖（ポリチミンオリゴマー・ポリアデニンオリゴマー）ハイブリダイゼーションを解離し、磁気ビーズだけを除去してmRNAを得る。それにDNAプローブを加えてmRNAにハイブリダイズさせる。得られた混合物を内径0.5〜1mm程度のキャピラリーゲル（アガロース1%）中に注入する。

【0025】キャピラリーゲルの注入口の上を長さ10mmのポリアクリルアミドゲル(8%T、3%C)あるいは半透膜で封じて、まず泳動分離と逆方向(ポリアクリルアミドゲルあるいは半透膜側)に電気泳動させる。すると、ハイブリダイズしたDNAプローブとフリーのDNAプローブでは後者の方が1桁近く速く泳動するので、フリーのDNAプローブは1~5分でポリアクリルアミドゲルあるいは半透膜を通過し、除去される。しかしハイブリダイズしたDNAプローブとmRNAはゲル表面あるいはゲル内に残る。そこで電界を通常分離方向としてハイブリドマーを分離する。

【0026】一定時間だけ電気泳動させた後、チューブゲルを抜き取り、ポリアクリルアミド平板ゲル上に乗せて2次元目の分離を行う。この2次元目の分離は、米国特許第4305799号明細書に記載された装置と類似の装置で行うことができる。すなわち、チューブ状ゲル部を加熱し、DNAプローブをmRNAから脱離せしめた後、DNAプローブをチューブゲルと直角方向に泳動させ、長さ分離する。DNAプローブの長さからmRNAの大きさ横方向の位置からDNAプローブがハイブリダイズしたmRNAの種類がわかり、検出されたDNAプローブ量からmRNAの量がわかる。

【0027】以上の各実施例では蛍光標識を使用する場合について説明したが、銀染色等の色素による標識、³²P等の放射性元素による標識、パーオキシダーゼとルミノールあるいはDigoxigen等の化学発光材料による標識も使用できる。標識として色素を用いる場合の検出手段としては光吸収が利用され、放射性元素あるいは化学発

光材料を用いる場合には、分離したDNAプローブをゲル中に保持し、化学発光材料の場合は発光試薬を添加して、感光フィルムにパターンを転写するなどの手法が用いられる。

【0028】

【発明の効果】以上述べたように本発明によれば、mRNAにハイブリダイズするDNAプローブの泳動速度を異ならせることにより、多数のDNAプローブを同時に分析し、それによって複数のmRNAの種類と量を同時に計測することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】mRNA試料の調整を示すフロー図。

【図2】磁気ビーズに捕捉したmRNAと結合する標識プローブを得るフロー図。

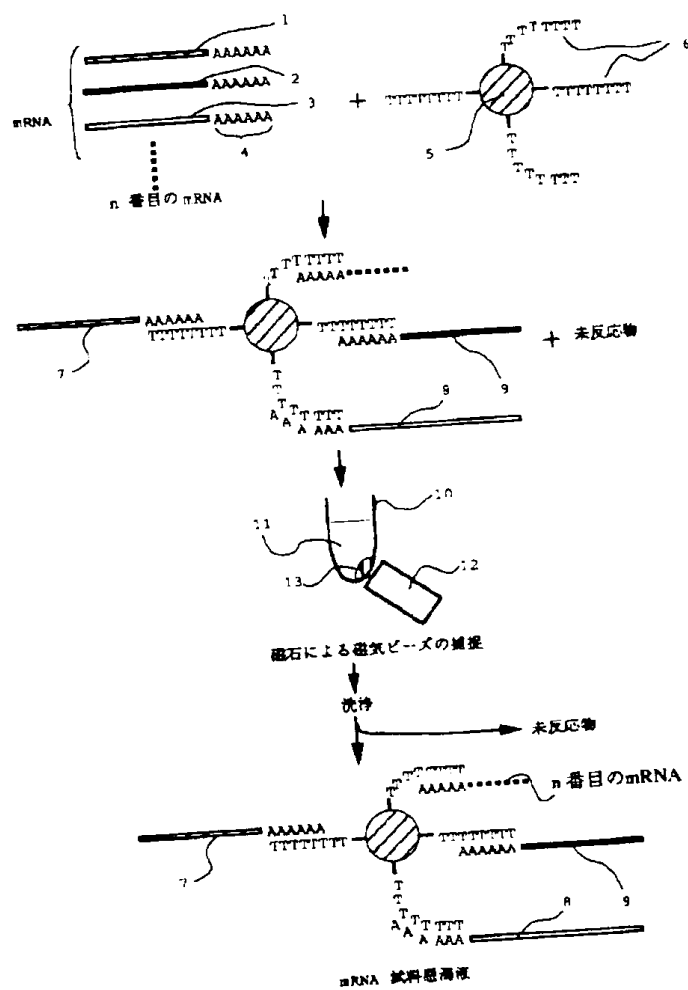
【図3】電気泳動による各プローブの分離分析を説明する概念図。

【符号の説明】

1, 2, 3...mRNA、4...ポリアデニン、5...磁気ビーズ、6...ポリチミンオリゴマー、7, 8, 9...磁気ビーズに捕捉されたmRNA、10...容器、11...反応液、12...磁石、13...磁気ビーズ、50...蛍光体、51, 52, 53...脱離した蛍光標識プローブ、101, 102, 103...磁気ビーズが捕捉したmRNAに結合した蛍光標識プローブ、201...キャピラリーゲル、202...ロート状の試料添加部兼負電極槽、205...磁石、206...加熱器、207...レーザー発振器、208...検出器、209...正電極槽、210...磁気ビーズ、211...反応液。

(7)

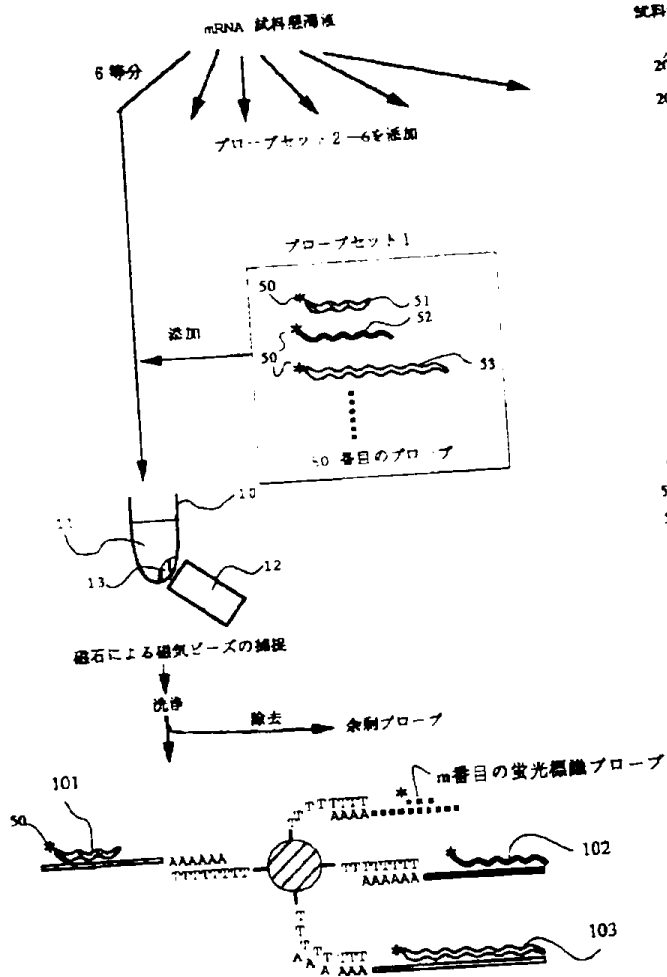
【図1】



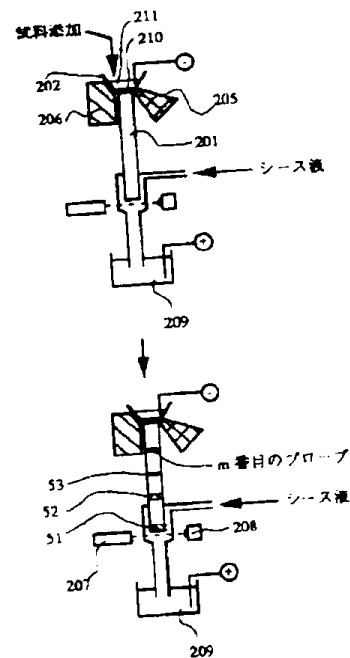
(8)

特開平6-294796

【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 古山 宏子
東京都国分寺市東荻ケ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内

PN - JP6294796 - 941021
PA - HITACHI LTD
I - G01N33/50; G01N27/447; G01N33/58
SI - C12Q1/68
TI - METHOD FOR ANALYZING NUCLEIC ACID
AB - PURPOSE: To simultaneously detects sorts and existent quantities of a plurality of mRNAs.
- CONSTITUTION: The mobility of each DNA probe is changed, by changing lengths of DNA probes 101, 102, 103 to be hybridized by each of a plurality of mRNAs of an object, and the plurality of mRNAs are identified and simultaneously analyzed, in the way of being identified by electrophoresis. Only DNA probes hybridized by mRNAs are taken out, DNA probes hybridized by each of the plurality of mRNAs are liberated by raising temperature, thereafter the electrophoresis is made, DNA probes are separated and detected by the difference of mobility, quantitative and qualitative analyses are carried out, and sorts and existent quantities of mRNAs are examined. DNA probes are labeled with a phosphor 50, coloring mater, radioactive element, chemiluminescence substance, etc.